

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE AISLAMIENTOS DE *Bordetella pertussis* DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN**

Por

Q.B.P. JESSICA LIZZETH GUTIÉRREZ FERMAN

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Enero, 2016

**ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE AISLAMIENTOS DE *Bordetella pertussis*
DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN**

COMITÉ DE TESIS

Presidente

Dra. Licet Villarreal Treviño

Secretario

Dra. Elvira Garza González

Vocal 1

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Vocal 2

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Vocal 3

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

AGRADECIMIENTOS

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios y a la Subdirección de posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Agradezco profundamente y con mucho cariño a mi madre: *Georgina Ferman Galán* y a mi padre: *Gelasio Gutiérrez Maldonado* por todo su amor y apoyo desde siempre. Ustedes son lo más preciado de mi vida, los amo.

A la *Dra. Licet Villarreal Treviño*, por todo el apoyo, por toda su paciencia y conocimientos brindados.

Agradezco a la *Dra. Elvira Garza González* por todas las oportunidades y toda la confianza brindada a lo largo de estos años. Por sus enseñanzas, consejos y por toda su paciencia, gracias.

A mi comité de tesis por su gran atención, amabilidad y apoyo: al *Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna*, al *Dr. Juan Francisco Contreras Cordero* y a la *Dra. Norma Laura Heredia Rojas*.

A *David Mizaél Ortíz Martínez*, con mucho amor. Gracias por siempre estar a mi lado, incluso en los momentos más difíciles. Te amo.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio, la *Dra. Samantha Flores*, el *Dr. Nestor Casillas*, a la *Dra. Soraya Mendoza*, al *MC Adrián Martínez*, a la *MC Paola Bocanegras*, por todo su apoyo tanto en la vida personal como profesional y por su amistad, lo quiero mucho.

A mis amigos: *Alan Tobías*, *Edgar López*, *Mayra Meléndez*, *Zulema Sánchez*, *Claudia Plata* y *Martha López*.

Doy un agradecimiento con mucho cariño a *María de la Luz Duarte* por todos sus consejos y apoyo.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a las dos personas que más amo en el mundo

A mi madre: *Georgina Ferman Galán*

A mi padre: *Gelasio Gutiérrez Maldonado*

Jessi

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>B. pertussis</i>	3
2.2. ESQUEMA DE VACUNACIÓN EN MÉXICO Y SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA.....	3
2.3. TIPIFICACIÓN DE <i>B. pertussis</i>	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. HIPÓTESIS.....	7
5. OBJETIVOS	
5.1. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	8
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
6. MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	9
6.2. TOMA DE LA MUESTRA.....	9
6.3. CULTIVO.....	9
6.4. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS.....	10
6.5. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS.....	10
6.6. TIPIFICACIÓN MOLECULAR.....	13
6.6.1. PREPARACIÓN DE LOS DISCOS.....	13

6.6.2. ENSAYO DE RESTRICCIÓN.....	15
6.6.3. ELECTROFORESIS EN GEL POR CAMPOS PULSADOS.....	15
6.6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
7. RESULTADOS	
7.1. OBTENCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.....	17
7.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.....	17
7.3. PROCEDENCIA DE LOS AISLAMIENTOS.....	18
7.4. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	20
7.5. TIPIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.....	22
8. DISCUSIÓN.....	25
9. CONCLUSIONES.....	29
10. LITERATURA CONSULTADA.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de <i>Bordetella</i> .	10
2	Volumen necesario de reactivos para preparar mezcla de reacción para la PCR tiempo real múltiplex para la detección de los genes <i>IS481</i> , <i>pIS1001</i> y <i>hIS1001</i> .	11
3	Volumen necesario de reactivos para preparar mezcla de reacción de PCR tiempo real para la detección del gen <i>ptx</i> .	11
4	Volumen necesario de reactivos para preparar mezcla de reacción para la PCR tiempo real para la detección del gen <i>rnaSP</i> .	12
5	Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas en la PCR tiempo real multiplex para la identificación de las especies de <i>Bordetella</i> (Tatti et al. 2011).	12
6	Muestras representativas tomadas de manera aleatoria de cada año para la tipificación por EGCP.	13
7	Reactivos y concentraciones necesarias para buffer de restricción, para una reacción a un volumen final de 40 µl.	15
8	Criterios de diferenciación entre especies de <i>Bordetella</i> por PCR tiempo real múltiplex (Tatti et al. 2011).	17
9	Aislamientos colectados de cada una de las especies de <i>Bordetella</i> .	18

Tabla		Página
10	Número de aislamientos de <i>B. pertussis</i> colectados por municipio (2006-2014).	19
11	Número de dosis vacunales en la población estudiada, por rango de edad (2006-2014).	21
12	Número de clonas y subclonas detectadas por EGCP.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Resultados de la identificación de <i>B. pertussis</i> mediante PCR tiempo real multiplex. Amplificación de los genes a) <i>ptxS1</i> (Ct < 40), b) <i>rnasA</i> P (Ct < 40), c) <i>IS481</i> (Ct < 35) y d) control negativo.	18
2	Número de aislamientos de <i>B. pertussis</i> , colectados por año (2006-2014), en el estado de Nuevo León.	19
3	Número de casos positivos de tosferina por edad, en el estado de Nuevo León (2006- 2014).	20
4	Porcentajes de vacunación por grupo de edad (2006-2014).	21
5	Dendograma de los aislamientos de <i>B. pertussis</i> .	23

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

EGCP	Electroforesis en Gel por Campos Pulsados
TBE	Tris, ácido bórico, EDTA
TE	Tris, EDTA
g	Gramos
h	Horas
M	Concentración molar
μ	microgramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

Introducción: *Bordetella pertussis* es el principal agente etiológico de la tosferina, una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio. A pesar de la vacunación, la enfermedad continúa siendo un importante problema de salud pública en México. **Objetivo:** El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética y la distribución temporal de los aislamientos de *B. pertussis* del estado de Nuevo León, México. **Métodos:** Los aislamientos fueron recuperados de pacientes con tosferina del 2006 al 2014. Los aislamientos fueron identificados por pruebas fenotípicas y genotípicas. Un total de 119 aislamientos de *B. pertussis* fueron seleccionados para determinar la diversidad clonal por Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (EGCP). Se incluyeron datos epidemiológicos y demográficos. **Resultados:** De los 356 aislamientos incluidos, 98% fueron identificados como *B. pertussis*, 1.7% como *Bordetella parapertussis* y 0.3% como *Bordetella bronchiseptica*. Se obtuvieron un total de 14 genotipos distintos con perfiles de 9 a 13 fragmentos de restricción y una similaridad del 75-100%. Se detectaron tres clonas predominantes: clona A (52.9%), A1 (11.7%), A2 (8.4%). Los años con mayor número de aislamientos de *B. pertussis* fueron el 2009, 2012 y el 2014 con 72, 74 y 64 aislamientos colectados, respectivamente. De la población estudiada, el grupo de edad más afectado fueron los infantes menores de 2 meses de edad con 156 casos reportados. De la población de infantes quienes debieron haber recibido al menos una de las dosis vacunales, el 85.9% no había recibido ninguna. **Conclusión:** Los resultados sugieren que la clona A es una cepa endémica del estado de Nuevo León y persistió por siete años consecutivos, del 2008 al 2014. Es necesario un análisis más detallado para determinar si la persistencia y diseminación de la clona endémica es resultado de una cepa virulenta o bien del estado inmunológico de la población.

ABSTRACT

Background: *Bordetella pertussis* is the major agent of whooping cough, a highly contagious disease of the respiratory tract. Despite the vaccination, the disease remains as a public health problem in Mexico. **Aim:** The aim of this study was to determine the genetic diversity and temporal distribution of *B. pertussis* isolates in Nuevo León, Mexico. **Methods:** Isolates were recovered from patients with pertussis from 2006 to 2014. The isolates were identified by phenotypic and genotypic tests. A total of 119 *B. pertussis* isolates were selected to determine the clonal diversity by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Epidemiological and demographic data were collected. **Results:** Of the 356 isolates included, 98% were identified as *B. pertussis*, 1.7% as *Bordetella parapertussis* and 0.3% as *Bordetella bronchiseptica*. A total of 14 different genotypes of profiles comprising 9 to 13 restriction fragments and a similarity of 75 to 100% were obtained by PFGE. Three predominant clones were detected, i.e., clone A (52.9%), A1 (11.7%) and A2 (8.4%). The years with the highest number of *B. pertussis* isolates were 2009, 2012 and 2014 with 72, 74 and 64 isolates collected, respectively. The age group most affected was ≤ 2 months with 156 cases reported. From the infant population who should have received at least one dose of acellular vaccine, the 85.9% did not have any doses. **Conclusion:** The results suggest that the clone A is endemic in Nuevo Leon and persisted for seven consecutive years, from 2008 to 2014. Further analysis is necessary to determinate if the persistence and spread of the endemic clone are a result a particularly virulent strain rather than the immune status of the study population.

1. INTRODUCCIÓN

La tosferina es una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa del tracto respiratorio humano causada principalmente por *Bordetella pertussis* (Melvin et al. 2014).

En México la vacunación contra la tosferina se inició en 1954 (Suárez et al. 2010), a pesar de esto, la tosferina ha permanecido como la quinta causa de muerte de las enfermedades prevenibles por vacunación en niños menores de cinco años de edad (Ulloa y Avila 2008), además las notificaciones de los casos de tosferina han aumentado en las últimas dos décadas, principalmente en adolescentes y adultos (de Gouw et al. 2014).

La tosferina es una enfermedad endémica y reemergente (Mooi et al. 2000). De acuerdo con los informes de la Dirección General de Epidemiología (DGE), en México, la reemergencia de la enfermedad ocurre cada 3-4 años. De manera particular, en el 2009 se reportó un brote en los estados del Noreste de México en donde Nuevo León, fue uno de los estados más afectados (SSNL 2014). La reemergencia de la enfermedad ha sido atribuida a muchos factores, en distintos países, entre los principales a la pérdida de inmunidad vacunal así como también a la adaptación del patógeno a la vacunación, lo que provoca la aparición de cepas de *B. pertussis* distintas a las cepas utilizadas para la producción de vacunas (Hallander et al. 2005). Además se ha demostrado que la población de *B. pertussis* ha cambiado a través del tiempo, desde el comienzo de la vacunación (Hardwick et al. 2002; Advani et al. 2004).

Las herramientas de tipificación molecular ha sido utilizadas para monitorear a algunos agentes infecciosos en la población (Nar Otgün et al. 2011). Particularmente la tipificación por Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (EGCP) es utilizada como una herramienta de vigilancia epidemiológica para conocer la variabilidad de los aislamientos de *B. pertussis* a través del tiempo y para la identificación de aislamientos asociados a brotes (Advani et al. 2004; de Moissac et al. 1994).

En México la reemergencia de la tosferina no ha sido explicada, esto hace necesario se mantenga una vigilancia epidemiológica permanente en las zonas endémicas así como también, resulta de gran importancia el monitorear la población de *B. pertussis* para conocer los cambios epidemiológicos genéticos a través de los años y su distribución temporal.

2. ANTECEDENTES

2.1. Características microbiológicas del microorganismo

B. pertussis son cocobacilos que miden de 0.2 a 0.3 μm de ancho y de los 0.5 a los 0.8 μm de largo y al microscopio pueden observarse de forma aislada o en parejas, raramente en cadenas. Son aerobios estrictos, Gram negativos e inmóviles con una temperatura óptima de crecimiento de entre 35 y 37 °C (Hegerle y Guiso 2014; Garrity et al. 2006). Las colonias de *B. pertussis* se pueden observar en agar carbón como pequeñas gotas color plateado, lisas, ligeramente convexas, con bordes regulares y olor característico de hipoclorito a los 3 días de crecimiento; raramente exceden los 3 mm de diámetro (Garrity 2006). En un perfil bioquímico *B. pertussis* es oxidasa y catalasa positivos y da resultados negativos para crecimiento en agar Mac Conkey, citrato de Simmons, urea de Christensen, reducción de nitratos y no muestra pigmentación en agar soya tripticasa (TSA), características principales que ayudan a su diferenciación con otras especies de este género (Garrity 2006).

2.2. Esquema de vacunación en México y situación epidemiológica

Las vacunas de células enteras contra *B. pertussis* fueron creadas poco tiempo después del descubrimiento del microorganismo (1906) (Weber et al. 2001) pero no se produjeron y aplicaron en México hasta el año de 1954 (Suárez et al. 2010). Su aplicación en infantes y niños marcó una disminución en la incidencia de la enfermedad (Guiso 2009). Sin embargo, la alta reactogenicidad y eficacia variable de estas vacunas condujeron a la introducción de las vacunas acelulares (Poolman y Hallander 2007).

En la actualidad todas las vacunas acelulares autorizadas contra la tosferina contienen el toxoide de la toxina pertussis en combinación con otros antígenos como la pertactina (PRN), la hemaglutinina filamentosa (FHA) y las

proteínas fimbriales tipo 2 y 3 (FIM 1 y FIM 2). Estas vacunas son multivalentes y protegen además contra otras enfermedades como la difteria, tétanos, poliomielitis, hepatitis B y/o meningitis causada por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hegerle y Guiso 2014). En nuestro país, la introducción de la vacuna acelular se inició en el 2007 e incluye únicamente la toxina de pertussis como antígeno de protección (Suárez et al. 2010).

En México el esquema de vacunación actual contra la tosferina está dirigido únicamente a infantes y niños preescolares y comprende la aplicación de cinco dosis vacunales. Las primeras cuatro corresponden a una vacuna pentavalente acelular DTwP- Hib-HB (difteria, tétanos, tosferina, *Haemophilus influenzae* y virus de la hepatitis b) en donde se incluye el toxoide de la toxina de la toxina pertussis y debe ser aplicada a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad. La quinta y última dosis corresponde a un refuerzo con una vacuna de células completas inactivadas DPT (difteria-tosferina-tétanos) en donde se incluyen las cepas vacunales Bp134 y Bp509 de *B. pertussis* y debe ser aplicada a los 4 años de edad (SSNL 2014).

La aplicación de las vacunas contra la tosferina ha favorecido la disminución de la morbilidad de la enfermedad de tal manera que en el año de 1980 la tasa de incidencia disminuyó a menos de 10 por 100,000 habitantes (SSNL 2014). Sin embargo, de acuerdo con los informes de la Dirección General de Epidemiología (DGE), en el año 2009 se notificó un brote de la enfermedad en los estados del Noreste de México con 579 casos positivos. El brote afectó principalmente a los estados de Nuevo León, Sonora, Tamaulipas, Jalisco, Durango, Chihuahua y Chiapas, siendo los niños menores de un año de edad, el grupo más afectado, representando el 85% del total de los casos (SSNL 2014). Además existe evidencia del incremento en el número de casos en adolescentes y adultos. Esto se ha atribuido principalmente a que la inmunidad vacunal disminuye con el tiempo y puede desaparecer transcurridos 4-12 años desde la última dosis quedando así, como la principal fuente de transmisión a la población infantil no vacunada (Moraga y Campins 2011).

Muchos otros factores podrían estar relacionados con el incremento de la incidencia y la reemergencia de la tosferina en nuestro país, incluyendo cambios demográficos, cambios en la efectividad de la vacuna, cambios en la cobertura de vacunación (Mooi et al. 2000) y la adaptación de la población de *B. pertussis* a la inmunidad inducida por vacunación, lo que provoca la aparición de cepas de *B. pertussis* distintas a las cepas utilizadas para la producción de vacunas (Hallander et al. 2005). La situación en México es desconocida. Para ello es necesario llevar cabo estudios de la población de *B. pertussis* a nivel molecular para así conocer sus cambios epidemiológicos a través de los años.

2.3. Tipificación de *B. pertussis*

La tipificación bacteriana es la identificación de diferentes tipos de microorganismos dentro de una misma especie. Los métodos de tipificación molecular han sido ampliamente utilizados para monitorear distintos agentes infecciosos en muchas poblaciones. Además los datos de vigilancia epidemiológica molecular contribuyen en la evaluación de políticas de vacunación (Nar Ogtun et al. 2011).

Dos métodos de tipificación bacteriana han sido utilizados para la diferenciación de cepas epidemiológicamente relacionadas de *B. pertussis*: el análisis por secuenciación de genes y la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (EGCP) (Hardwick et al. 2002). La EGCP ha sido utilizada como herramienta epidemiológica de elección en estudios de vigilancia para conocer la variabilidad de las cepas de *B. pertussis* a través de los años y para identificación de aislamientos asociados a brotes (Advani et al. 2004). Además ha permitido conocer las diferencias genéticas que existen entre los aislamientos circulantes y las cepas utilizadas para la elaboración de vacunas (Hallander et al. 2005), sugiriendo diferencias antigénicas entre los aislamientos (Weber et al. 2001). Por otro lado ha permitido conocer la distribución temporal de los aislamientos de *B. pertussis* en distintas zonas geográficas y establecer patrones de trazabilidad así como también ha permitido el caracterizar cepas endémicas del microorganismo (De Moissac et al. 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

La tosferina es una enfermedad reemergente, por lo que es de gran importancia monitorear los aislamientos de *B. pertussis* para conocer sus cambios epidemiológicos a través de los años.

4. HIPÓTESIS

Los aislamientos circundantes de *B. pertussis* presentan variabilidad clonal a través de los años.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la variabilidad clonal de aislamientos clínicos de *B. pertussis* y conocer su distribución a través temporal.

5.2. Objetivos específicos

1. Colectar aislamientos de *B. pertussis* a partir de personas con sospecha clínica de tosferina.
2. Identificar los aislamientos mediante pruebas fenotípicas y genotípicas.
3. Determinar la diversidad clonal de los aislamientos de *B. pertussis*.
4. Evaluar la distribución temporal de los aislamientos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio

Se incluyeron aislamientos colectados a partir de pacientes con tosferina en el laboratorio Estatal de Servicios de Salud pública de la Secretaría de Salud de Nuevo León. Los aislamientos se colectaron de diciembre 2009 a diciembre del 2014. En el estudio se incluyeron datos epidemiológicos y demográficos de los pacientes con tosferina.

6.2. Toma de muestra

Se tomaron dos hisopados nasofaríngeos por separado (hisopos de rayón con mango flexible, 100 mm, COPAN, flock technologies, no. de catálogo 516CS01). Uno de los hisopos se colocó en un tubo con medio de transporte semisólido Regan-Lowe (Becton Dickinson) y se utilizó para la identificación fenotípica. El hisopo restante se colocó en un tubo con solución salina fisiológica (0.85%) y cefalexina (0.04 mg/ml) y se utilizó para realizar la identificación genotípica. Las muestras se mantuvieron una temperatura de 5°C hasta su posterior análisis.

6.3. Cultivo

Se retiró el hisopo del medio de transporte semisólido Regan-Lowe y se sembró en dos placas de medio con agar carbón (Becton, Dickinson, Franklin lakes, NJ) y sangre de carnero desfibrinada al 5%, una placa con y otra sin solución con cefalexina a una concentración de 0.04 mg/ml. Ambas placas fueron incubadas a una temperatura de 37 °C con alto grado de humedad y fueron revisadas diariamente por un periodo máximo de 10 días. Posteriormente se les realizó la identificación fenotípica y genotípica a los aislamiento que presentaron una morfología colonial característica de las especies de *Bordetella*.

6.4. Identificación fenotípica de los aislamientos

Una vez obtenidas las colonias típicas en las placas primarias se procedió a realizar una tinción de Gram y la prueba de catalasa. Las colonias que fueron cocobacilos Gram negativos y catalasa positivos se sembraron en medio con agar carbón y sangre de carnero desfibrinada 5% y se dejaron incubar a 37 °C con alto grado de humedad por 72 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes (tabla 1).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de *Bordetella*.

Prueba bioquímica	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Prueba de oxidasa	+	-	+
Prueba bioquímica	-	+	+
Urea de Christensen	-	+	+
Citrato de Simmons	-	-	+
Prueba de nitratos	-	-	+
Movilidad	-	-	+
Pigmentación en medio HIT	-	+(48 h)	-

HIT: agar infusión de corazón suplementado con tirosina a una concentración del 0.1%.

6.5. Identificación genotípica de los aislamientos

Se realizó la obtención de ADN utilizando un equipo MagNA Pure LC 2.0 de Roche con un kit de extracción para ácidos nucleicos III (Roche Applied Science) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los ensayos de PCR tiempo real se realizaron en un volumen final de 25 µl en una placa de 96 pocillos y empleando el equipo ABI 7,500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). Para cada uno de los especímenes se incluyeron dos PCR tiempo real, la primera PCR tiempo real multiplex para la detección de los genes *IS481*, *pIS1001* y *hII1001* y la segunda PCR tiempo real para la detección del gen *ptx* de la toxina de pertussis. Para ello se agregaron a cada celdilla 21 µl de la mezcla de reacción y 4 µl de ADN extraído (tabla 2 y 3).

Como control positivo de extracción se incluyó una PCR tiempo real para el gen humano *rnasaP* y como control negativo 21 µl de la mezcla de reacción con 4 µl de agua grado molecular estéril (Corning, no. de catálogo 25-055-LH). Las secuencias de los iniciadores y las sondas utilizadas se muestran en la tabla 4. Finalmente se programaron las siguientes condiciones: incubación UDG a 50 °C por 2 min, activación de la enzima a 95 °C por 10 min y 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s y alineamiento y amplificación a 60 °C por 1 min (Tatti 2011).

Tabla 2. Volumen necesario de reactivos para preparar mezcla de reacción para la PCR tiempo real multiplex para la detección de los genes *IS481*, *pIS1001* y *hIS1001*.

Gen blanco	Reactivo	Volumen (µl)
<i>IS481</i>	PF (3 µM)	0.84
	PR (3 µM)	0.84
	Sonda (9 µM)	0.84
<i>pIS1001</i>	PF (9 µM)	0.84
	PR (9 µM)	0.84
	Sonda (3 µM)	0.84
<i>hIS1001</i>	PF (3 µM)	0.84
	PR (3 µM)	0.84
	Sonda (3 µM)	0.84
	Master Mix (2X)*	12.5
	Agua	0.94
	Volumen final	21

PF: primer forward, primer reverse, *:TaqMan Gen Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems, no. catalogo 4369016).

Tabla 3. Volumen necesario de reactivos para preparar mezcla de reacción para la PCR tiempo real para la detección del gen *ptx*.

Gen blanco	Reactivo (C _t)	Volumen (µl)
<i>ptx</i>	PF (7 µM)	0.84
	PR (7 µM)	0.84
	Sonda (3 µM)	0.84
	Master Mix*	12.5
	Agua	5.98
	Volumen final	21

PF: primer forward, PR: primer reverse, *:TaqMan Gen Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems, no. catalogo 4369016).

Tabla 4. Volumen necesario de reactivos para preparar mezcla de reacción para la PCR tiempo real para la detección del gen *rnasaP*.

Gen blanco	Reactivo (Cf)	Volumen (μl)
<i>rnasaP</i>	PF (4 μM)	0.84
	PR (4 μM)	0.84
	Sonda (1 μM)	0.84
	Master Mix*	12.5
	Agua	5.98
	Volumen final	21

PF: primer forward, PR: primer reverse, *:TaqMan Gen Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems, no. catalogo 4369016).

Tabla 5. Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas en la PCR tiempo real multiplex para la identificación de las especies de *Bordetella* (Tatti M. K., et al 2011).

Gen blanco	Iniciador y sonda	Secuencia de 5' → 3'	Tamaño (pb)
<i>IS481</i>	852U18	CAAGGCCGAACGCTTCAT	6
	894L24	GAGTCTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA	
	871U22P ^a	CAGTCGGCCTTGCGTGAGTGGG	
<i>hIS1001</i>	BHIS41U20	GGCGACAGCGAGACAGAATC	6
	BHIS91L17	GCCGCCTTGGCTCACTT	
	BHIS62U28P ^b	CGTGCAGATAGGCTTTTAGCTTGAGCGC	
<i>pIS1001</i>	135U17	TCGAACGCGTGGAATGG	6
	199L20	GGCCGTTGGCTTCAAATAGA	
	157U21P ^c	AGACCCAGGGCGCACGCTGTC	
<i>ptxS1</i>	402U16	CGCCAGCTCGTACTTC	5
	442L15	GATACGGCCGGCATT	
	419U22P ^d	AATACGTCGACACTTATGGCGA	
<i>rnaseP</i>	<i>rnaseP</i> forward	CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG	8
	<i>rnaseP</i> reverse	TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAGG	
	<i>rnaseP</i> ^e	CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC	

a: Sonda, extremo 5' marcado con 6-carboxifluoresceína (FAM) y extremo 3' con Black Hole Quencher 1 (BHQ1).

b: Sonda, extremo 5' marcado con Quasar 670 y extremo 3' con Black Hole Quencher 3 (BHQ3).

c: Sonda, extremo 5' marcado con hexaclorofluoreína (HEX) y 3' marcada con (BHQ1).

d: Sonda, extremo 5' marcado con 6-carboxifluoresceína (FAM) y 3' con Black Hole Quencher 1 (BHQ1).

6.6. Tipificación molecular

La tipificación de los aislamientos se realizó mediante la técnica de Electroforesis en Gel por campos Pulsados. Para ello 119 de un total 352 aislamientos de *B. pertussis* fueron seleccionadas de manera aleatoria por un segundo ciego utilizando un nivel de confianza del 99% e intervalos de confianza de 10 (tabla 6).

Tabla 6. Muestras representativas tomadas de manera aleatoria de cada año.

año (estratos)	N_i	n_i
2007	4	1
2008	34	12
2009	76	24
2010	11	4
2011	41	14
2012	74	25
2013	51	17
2014	67	22
Total	352	119

N_i: total de aislamientos por año; n_i: muestra representativa de cada año.

6.6.1. Preparación de los discos

Como primer paso, los aislamientos fueron cultivados en placas con agar carbón con sangre de carnero desfibrinada al 5% y cefalexina 0.04 µg/ml y se dejaron incubar con alto grado de humedad a 36-37 °C por 72 h (Incubadora Lab Cli-Micro, modelo 0166). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomó de cada uno de los aislamientos, una sola colonia y se resembró e incubó a las mismas condiciones. Posteriormente se preparó una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a 4 de la escala de McFarland en 5 ml de solución salina estéril y se homogenizaron en un agitador tipo vortex (Deluxe, modelo S8220). Una vez realizado, se tomaron 2 ml de cada una de las suspensiones y se colocaron en viales estériles de 2 ml.

De manera siguiente los viales se centrifugaron a 13,500 rpm por 5 min (Iec Microelite modelo RF) y se decantó el sobrenadante sin remover la pastilla de células. Posterior a esto se agregó 1 ml de la solución PIV estéril y frío (Tris 10 mM, pH8 y NaCl 1.0 M) y se homogenizó suavemente por pipeteo hasta obtener una solución homogénea, una vez realizado se centrifugaron a las mismas condiciones. Nuevamente se decantó el sobrenadante y se agregaron 410 µl de PIV frío.

Para la preparación de los discos se utilizó agarosa para EGCP a una concentración del 1.5% (Bio-Rad, no. de catálogo 1620138) utilizando como diluyente TBE 0.5X estéril (anexo 1) y se mantuvo a una temperatura constante de entre 50 ± 2 °C en un baño seco (Labnet international, modelo D1200). A cada una de las muestras ya homogenizadas, se les agregaron 150 µl de agarosa fundida, se mezclaron suavemente por pipeteo, e inmediatamente se tomaron 35 µl y se colocaron en una superficie de vidrio forrada con parafilm dejándose enfriar por ≈ 15 min.

Posteriormente, los discos fueron transferidos a un tubo Falcon con capacidad de 15 ml y se agregó 1 ml de buffer de lisis (Tris 6mM, pH 8, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, pH 8, 0.2% desoxicolato de Na, 0.5% de lauril sarcosinato de Na, lisozima 0.5 mg/ml y RNAsa 50 µg/ml) dejándose incubar a 37 °C por 3 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación los discos se filtraron y se les agregó 1 ml de solución ES con proteinasa K a una concentración final de 0.5 mg/ml y se dejaron incubar durante la noche (~ 17 h). Al día siguiente los discos fueron filtrados nuevamente, se les agregaron ~ 13 ml de buffer TE 1X (Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 1mM, pH 8) y se dejaron mezclar por inversión en una barra agitadora a temperatura ambiente por el transcurso de 1 h. Este procedimiento se repitió 4 veces más. Una vez realizado, los discos se mantuvieron en 5 ml de buffer TE 1X a temperatura de refrigeración.

6.6.2. Ensayo de restricción

Para poder llevar a cabo el ensayo de restricción se transfirió un solo disco de cada aislamiento a un tubo Eppendorf de 2 ml. Posterior a esto, se añadieron 40 μ l de buffer de restricción con 20 U de enzima XbaI (Promega, no. de catálogo R6181) y se dejó incubar a 37 °C (Tabla 4).

Tabla 7. Reactivos y concentraciones necesarias para buffer de restricción para una reacción a un volumen final de 40 μ l.

Reactivo	Volumen para una reacción (μ l)
XbaI (10 U/ μ l)	2
BSA (10mg/ml)	0.8
Buffer 10X M	4
Agua	33.2
Total	40

6.6.3. Electroforesis en Gel por Campos Pulsados

Se utilizó una cámara electroforética CHEF III, marca Bio-Rad añadiéndole 3.5 L de buffer TBE 0.5X estéril y se dejó alcanzara los 14°C. Una vez realizado se colocaron los discos en cada uno de los dientes del peine y se agregó agarosa fundida para campos pulsados al 1% utilizando como diluyente TBE 0.5X estéril. Se dejó solidificar por ~15 min y una vez transcurrido se retiró el peine con cuidado de no dañar los discos. En los pocillos se vertió un excedente de agarosa para campos pulsados a la misma concentración. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se dejó correr a las siguientes condiciones: Ti: 2.2, Tf: 55.0, 6 V, 26 h y 40 min a 14 °C (Bisgard 2001). Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se colocó en 300 ml de una solución con bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/ml por 30 min. Posteriormente se decantó la solución y se agregaron 300 ml de agua bidestilada y se dejó lavar toda la noche. La visualización de las bandas se logró empleando un foto-documentador UVP y se digitalizó con un software Labworks.

6.6.4. Análisis estadístico

A partir de los datos arrojados se determinó la variabilidad de los aislamientos generando un dendograma con ayuda del software SPSS versión 20, utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo y la medida de Jaccard.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de los aislamientos

Se obtuvieron un total de 359 aislamientos colectados de diciembre del 2006 a diciembre del 2014.

7.2. Identificación de los aislamientos

Los aislamientos fueron identificados mediante pruebas fenotípicas. Para la identificación genotípica y la diferenciación de especies de *Bordetella* se siguieron los criterios establecidos por Tatti y colaboradores (2011) (tabla 8). Todos los aislamientos que amplificaron el gen *ptxS1* con un Ct (ciclo umbral) < 40 y la secuencia de inserción *IS481* con un Ct < 35 fueron identificados como *B. pertussis* (figura 1).

Tabla 8. Criterios de diferenciación entre las especies de *Bordetella* por PCR tiempo real multiplex (Tatti et al. 2011).

Especies	Amplificación de genes			
	PCR-TR única <i>ptxS1</i> ^a	PCR-TR multiplex		
		<i>IS481</i>	<i>hIS1001</i> ^a	<i>pIS1001</i> ^a
<i>B. pertussis</i>	+	+ ^b	-	-
<i>B. parapertussis</i>	+	-	-	+
<i>B. holmessi</i>	-	+	+	-
<i>B. bronchiseptica</i>	+	-	-	-
<i>B. pertussis</i> y <i>B. parapertussis</i>	+	+	-	+
<i>B. pertussis</i> y <i>B. holmesii</i>	+	+	+	-

PCR-TR: PCR tiempo real, ^a: un Ct < 40 fue considerado como una amplificación positiva y un Ct ≥ 40 como negativa. ^b: un Ct < 35 fue considerado como una amplificación positiva de *IS481* en *B. pertussis*.

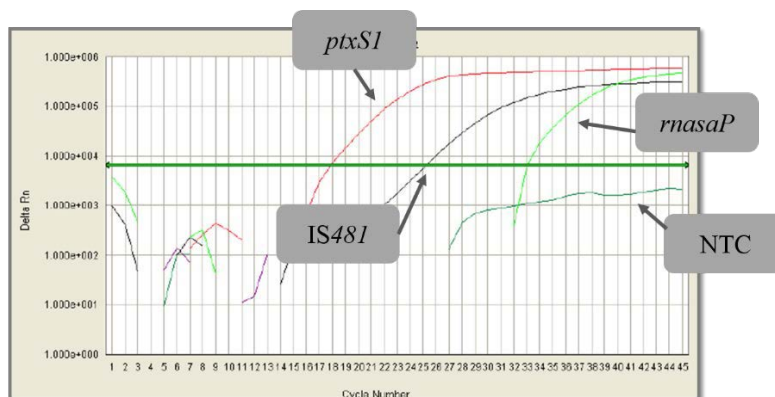


Figura 1. Resultados de la identificación de *B. pertussis* mediante PCR tiempo real multiplex. Amplificación de los genes a) *ptxS1* (Ct < 40), b) *rnsaP* (Ct < 40), c) *IS481* (Ct < 35) y d) control negativo.

Del total de los aislamientos colectados el 98% (352/359) fueron identificados como *B. pertussis*, el 1.7% (6/359) se identificaron como *B. parapertussis* y solo el 0.3% (1/359) como *B. bronchiseptica* (tabla 9).

Tabla 9. Aislamientos colectados de cada una de las especies de *Bordetella*.

Especie	n(%)
<i>B. pertussis</i>	352 (98%)
<i>B. parapertussis</i>	6 (1.7%)
<i>B. bronchiseptica</i>	1 (0.3%)
Total	359

n: número de aislamientos identificados de cada una de las especies, (%): porcentaje correspondiente.

7.3. Procedencia de los aislamientos

Del total de los aislamientos de *B. pertussis* colectados de diciembre del 2009 a diciembre del 2014, el 46% (160/352) se obtuvo de la jurisdicción 4 correspondiente a los municipios de Guadalupe, Juárez y Apodaca, el 21% (72/352) de los aislamientos se colectaron de la jurisdicción 1 correspondiente al municipio de Monterrey y un 13% (46/352) a la jurisdicción 2 correspondiente a los municipios de San Nicolás de los Garza, General Escobedo, Zuazua, Ciénega de Flores, Mina, Salinas Victoria, Hidalgo, El Carmen y Abasolo (tabla 10).

Tabla 10. Número de aislamientos de *B. pertussis* colectados por municipio (2006-2014).

Jurisdicción	n(%)	Municipios que comprende
1	72(21)	Monterrey.
2	46(13)	San Nicolás de los Garza, Gral Escobedo, Zuazua, Ciénega de Flores, Mina, Salinas Victoria, Hidalgo, El Carmen y Abasolo.
3	30(9)	García, San Pedro y Santa Catarina.
4	160(46)	Guadalupe, Juárez y Apodaca.
5	8(2)	Aguaileguas, Anahuac, Bustamante, General Treviño, Lampazos, Parras, Sabinas Hidalgo, Vallecillo y Villaldama.
6	11(3)	Aldamas, Cadereyta Jiménez, Cerralvo, China, Dr. Coss, Dr. González, General Bravo, Herreras, Higueras, Marín, Melchor Ocampo, Pesquería and Ramones.
7	19(5)	Allende, General Terán, Hualahuises, Linares, Montemorelos, Rayones and Santiago.
8	5(1)	Arramberri, Dr. Arrollo, Galeana, General Zaragoza, Iturbide and Mier y Noriega.

n: número de aislamientos de *B. pertussis* colectados, (%): porcentaje correspondiente.

La figura 2 muestra el número de aislamientos de *B. pertussis* colectados por año en el estado de Nuevo León. De la misma manera se muestra un incremento en el número de casos de tosferina causados por *B. pertussis* cada 2-3 años. En el periodo estudiado, el año 2012 fue el año con mayor número de casos de tosferina, representando 74 de los 352 aislamientos colectados, seguido del año 2009 con 72 aislamientos y el año 2014 con 64 aislamientos colectados.

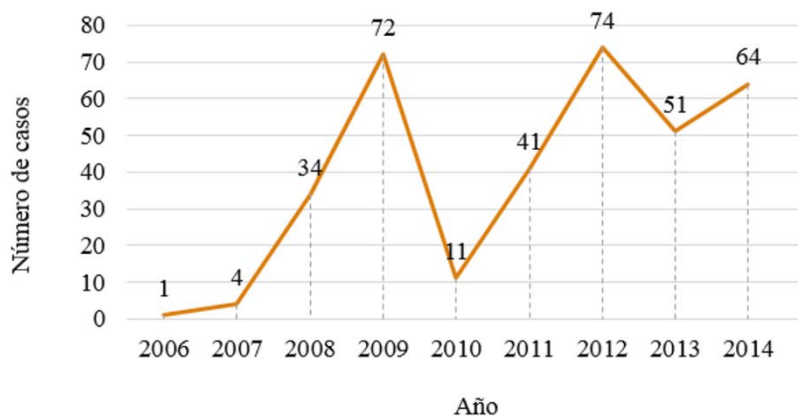


Figura 2. Número de aislamientos de *B. pertussis*, colectados por año (2006-2014), en el estado de Nuevo León.

7.4. Datos epidemiológicos de la población estudiada

Del total de la población estudiada, la más afectada fueron los infantes ≤ 2 meses de edad representado el 44% (156/352) de los casos registrados, seguido de los niños de 3 meses a 4 años de edad con un 31.5% (111/352), en tercer lugar los adultos de 20 a 49 años de edad con un 14.5% (51/352), los jóvenes de 12 a 19 años de edad con 4.6% (16/352), los niños de 5 a 11 años con un 3.1% (11/352) y finalmente los adultos ≥ 50 años de edad con 1.4% (5/352) casos reportados. A dos de los casos reportados (0.6%) no se les reportó la edad (figura 3).

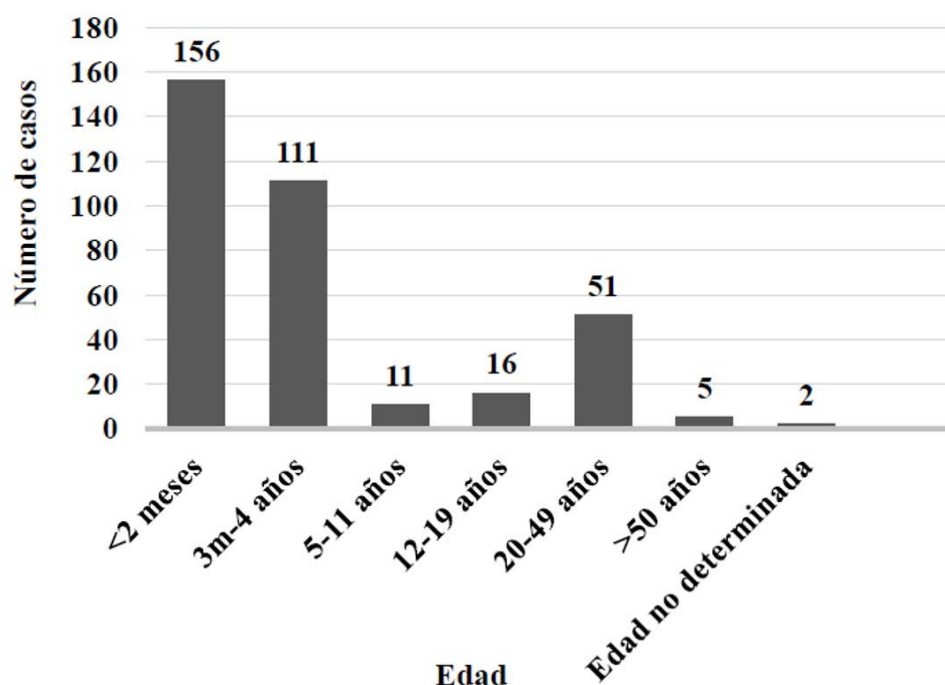


Figura 3. Número de casos positivos de tosferina por edad, en el estado de Nuevo León (2006-2014).

Del grupo de los infantes ≤ 2 meses de nacidos, el 85.9% (134/156) no tenía ninguna de las dosis vacunales y tan solo el 11.5% (18/156) tenía una sola dosis. Del grupo de 3 meses a 4 años de edad, el 40.5% (45/111) no presentaban ninguna dosis, un 41.4% (46/111) tenía 1 sola dosis y tan solo el 14.4% (16/111) tenía más de 2 dosis.

Del tercer grupo de edad más afectado, los adultos de 20 a 49 años de edad, solo el 2% (1/51) tenía una sola dosis y el 2% (1/51) más de dos dosis vacunales e interesantemente el 92.1% (47/51) no sabía si se le había aplicado alguna dosis vacunal contra la tosferina (tabla 11 y figura 4).

Tabla 11. Número de dosis vacunales en la población estudiada, por rango de edad (2006-2014).

Rango de edad	Dosis n(%)				Total
	0 dosis	1 dosis	>2 dosis	ND	
≤2 meses	134 (85.9)	18 (11.5)	0 (0)	4 (2.6)	156
3meses-4años	45 (40.5)	46 (41.4)	16 (14.4)	4 (3.6)	111
5-11 años	2 (18.2)	1 (9.1)	0 (0)	8 (72.7)	11
12-19 años	2 (12.5)	0 (0)	0 (0)	14 (87.5)	16
20-49 años	2 (3.9)	1 (2)	1 (2)	47 (92.1)	51
≥50 años	1 (20)	0 (0)	0 (0)	4 (80)	5
dosis desconocida	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2

n: número de pacientes, (%): porcentaje de vacunación correspondiente a cada grupo de edad.

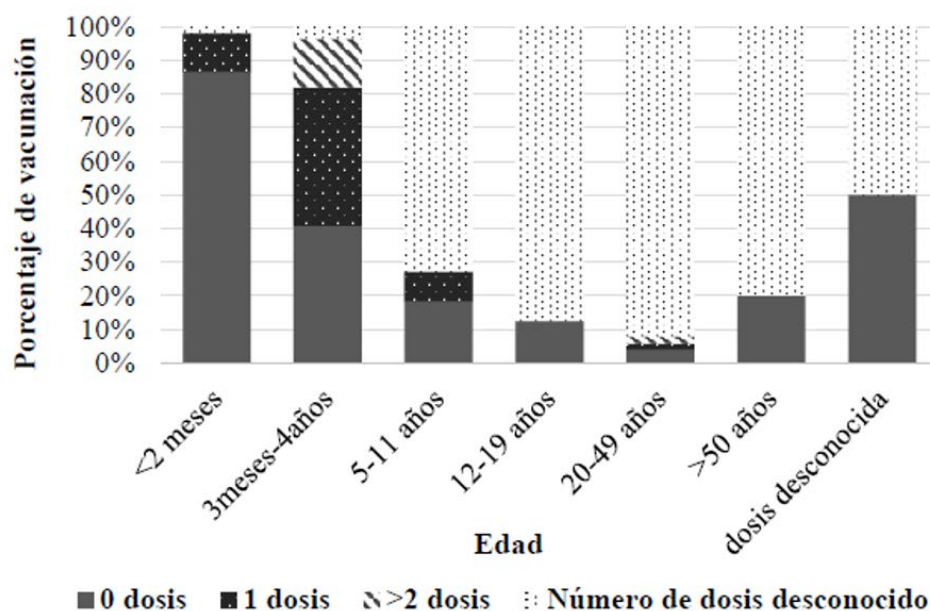


Figura 4. Porcentajes de vacunación por grupo de edad (2006-2014).

7.5. Tipificación de los aislamientos

El corte con la enzima de restricción XbaI generó un total de 14 genotipos compuestos de 9 a 13 fragmentos. La figura 5 muestra el dendograma generado a partir del análisis de cada uno de los patrones de restricción. Los aislamientos presentaron una similitud del 75 al 100%. Se detectó la presencia de 1 clona predominante designada como clona A, la cual presentó 10 fragmentos de restricción y 10 subclonas designadas de la A1 a la A10. El número de la subclona fue designado por predominancia y después por las diferencias en los patrones de restricción siguiendo los criterios de Tenover (1995). La clona A representó el 54.6% (65/119) del total de los aislamientos tipificados y las dos subclonas predominantes A1 y A2 representaron el 11.7% (14/119) y el 8.4% (10/119) de los aislamientos respectivamente (tabla 12).

A5

A9

A4

A

A10

A7

A1

A2

A3

A8

A6

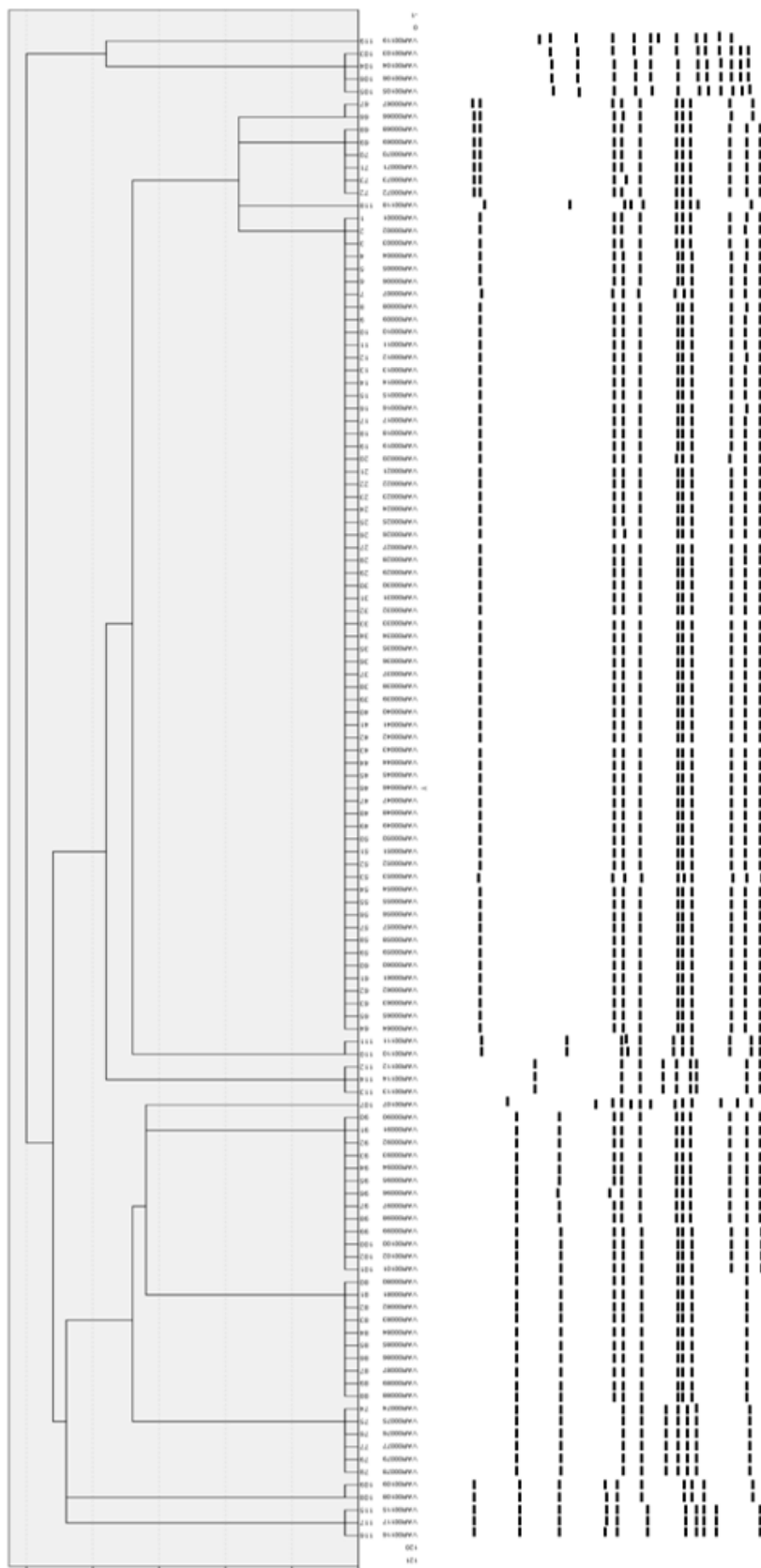


Tabla 12. Número de clonas y subclonas detectadas por EGCP.

Clonas* y subclonas	n(%)
A*	65 (54.6)
A1	14 (11.7)
A2	10 (8.4)
A3	6 (5.0)
A4	6 (5.0)
A5	4 (3.0)
A6	3 (2.5)
A7	3 (2.5)
A8	2 (1.6)
A9	2 (1.6)
A10	2 (1.6)
Otros perfiles	3 (2.5)

En la figura 6 se muestra la distribución de las clonas y subclonas predominantes a través de los años. Como se puede observar la clona A fue aislada desde el año 2008 y a partir del 2010 presentó una tendencia de incremento. Interesantemente la clona A representó 24 de los 25 aislamientos tipificados del año del 2012 (95%). La subclona A1 fue aislada del año 2007 al 2011 con un alza en el 2009. Por otro lado, la subclona A2 fue aislada en los años 2007 al 2014.

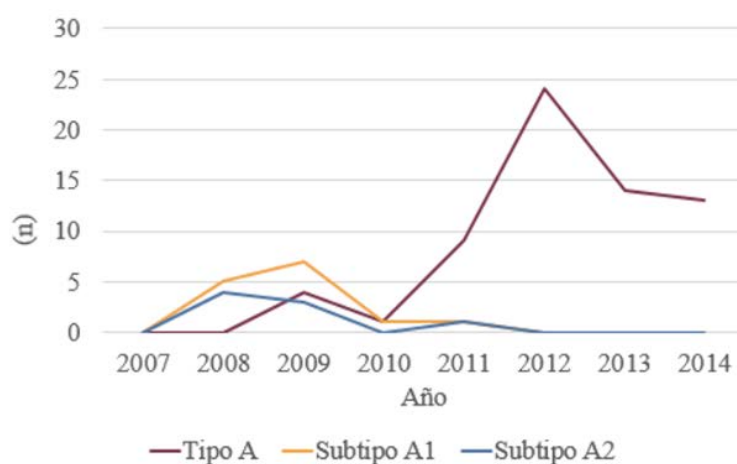


Figura 6. Distribución de las clonas predominantes a través de los años (2006-2014).

8. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de los aislamientos de *B. pertussis* del estado de Nuevo León por EGCP, método el cual demostró una similitud del 75 hasta el 100% entre los aislamientos analizados.

Se detectó la presencia de una clona predominante, la clona A, la cual persistió durante un periodo de siete años consecutivos, del 2008 hasta el 2014. Interesantemente representó una frecuencia del 54.6% (65/352) de los aislamientos analizados. La subclona A1, se aisló en los años del 2008 al 2011 y representó el 11.7% de los aislamientos. Por otro lado la subclona A2 representó solo el 8.4% de los aislamientos analizados y fue aislada también del 2008 al 2011. Estos resultados sugieren la presencia de una clona endémica del estado de Nuevo León, la cual de acuerdo con la definición (Tenover et al. 1995) una cepa endémica son aislamientos que son recuperados frecuentemente de pacientes infectados en un ambiente del cuidado de la salud o en una comunidad y que son indistinguibles o muy relacionados unos de otros por métodos de tipificación.

La figura 6 muestra la distribución de las clonas a través de los años. La clona A aparece en el año 2008 y a partir del año 2010 y su aislamiento se incrementa en los años del 2011 y 2012. Interesantemente la clona A representó 24 de los 25 aislamientos analizados por EGCP, es decir presentó una frecuencia del 95% del total de los aislamientos analizados en el año del 2012, año en el que se incrementaron los casos de tosferina en el estado de Nuevo León (figura 2). Interesantemente en el año 2009, año en donde se reportó un brote de tosferina en los estados del norte de México, las dos subclonas predominantes muestran un alza.

En México, particularmente en el estado de Nuevo León, en los años 2009 y 2012 se presentó un aumento en el número de casos positivos para la enfermedad (figura 2).

De la población estudiada, el grupo de edad más afectado fueron los infantes de ≤ 2 meses de edad representando 44% (156/352) de los casos, siguiéndole los niños de 3 meses a 4 años de edad con un 31.5% (111/352) de los casos. La tosferina ha sido considerada por muchos años atrás como una enfermedad pediátrica, debido a que principalmente afectaba a infantes y niños menores de 5 años de edad. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha reportado un aumento en el número casos de tosferina en adolescentes y adultos (de Gouw et al. 2014).

En este estudio los adultos de 20 a 49 años de edad fueron el tercer grupo más afectado, representando 14.5% (51/352) de los aislamientos colectados, siguiéndole los jóvenes de 12 a 19 años de edad con un 4.6% (16/352). El incremento en el número de notificaciones en estos rangos de edad representa un factor de riesgo significativo ya que estas personas quedan como la principal fuente de transmisión a infantes y niños no vacunados (Bisgard et al. 2004). Además, se ha demostrado, que la inmunidad vacunal contra la tosferina disminuye con el tiempo y puede desaparecer transcurridos 4-12 años desde la última dosis (Moraga y Campins, 2011). México es el único país en Latino América que aplica vacunas acelulares rutinariamente, utilizando el mismo programa de dosificación en infantes y niños menores de cinco años de edad. Solamente en Argentina y Panamá se emplea el uso de una vacuna de refuerzo en adolescentes para reducir la fuente potencial de infección hacia los infantes y niños (Ulloa 2010).

El 85.9% de los infantes ≤ 2 meses de edad quienes debieron haber recibido al menos una dosis vacunal acelular, no contaban con ninguna de las dosis. Tan solo un 11.5% presentaba una de las dosis. De los niños de 3 meses a 4 años de edad, quienes debieron haber recibido al menos 4 dosis vacunales acelulares, un 40.5% no presentaba ninguna dosis vacunal mientras que un 41.4% presentaba una sola dosis y tan solo un 14.4% presentaba más de dosis vacunales. En la actualidad, todas las vacunas autorizadas contra la tosferina, contienen el toxoide de la toxina de pertusis (PTX) como agente protector con una o más adhesinas de *B. pertussis* en

diferentes combinaciones. PTX con la Hemaglutinina filamentosa (FHA), con FHA y pertactina (PRN), o bien, PRN y proteínas fimbriales tipo 2 y 3 (Hegerle N y Guiso N. 2014). Sin embargo en Dinamarca y en México, se emplean solo el toxoide de la PTX en las vacunas acelulares como único agente protector contra la tosferina (Thierry et al. 2013). La sustitución casi por completo de la vacuna de células completas por la vacuna acelular en el esquema de vacunación en México, se inició en el año del 2007 (Suárez et al. 2010). Se ha postulado que los altos niveles de cobertura de vacunación con vacunas acelulares ejercen una presión selectiva sobre los genes que codifican para estos factores de virulencia, impulsando la aparición de cepas de *B. pertussis* que poseen genes variantes y una expresión de proteínas distintas a las utilizadas como antígenos protectores en las vacunas acelulares (Byrne y Slack 2006).

La PTX es una proteína que consta de cinco subunidades (S1-S5) codificadas por los genes *ptxA-ptxE* respectivamente y son controlados por el promotor *ptxP*, sin embargo en la subunidad S1 es donde se han definido los epítomos de las células T y B del sistema inmunológico. Estudios de genotipificación han mostrado la existencia de cinco variantes alélicas de la región *ptxA* de la ptx, sugiriendo que estas variaciones puedan tener algún impacto en la efectividad de la vacuna (Hegerle y Guiso 2014).

Se colectó un total de 359 aislamientos de diciembre del 2006 a diciembre del 2014. El 98% (352/359) de los aislamientos fue identificado como *B. pertussis* y el 1.7% (6/359) fue identificado como *B. parapertussis* (tabla 9). *B. pertussis* es el principal agente etiológico de la tosferina, sin embargo, otras especies como *B. parapertussis* ha sido reportadas en un menor número de casos, aproximadamente un 14% del total de los aislamientos (Melvin et al. 2014). Solo uno de los casos (1/359), es decir un 0.3%, fue identificado como *B. bronchiseptica*. Este aislamiento fue recuperado de un paciente de sexo femenino de 48 años de edad, proveniente del municipio de Guadalupe, Nuevo León. *B. bronchiseptica* infecta a un amplio rango de mamíferos, raramente al humano. Si bien, causa infecciones en el tracto respiratorio de animales, con manifestaciones como traqueobronquitis aguda en perros o rinitis atrófica en cerdos, en humanos es distinto, presentando casos esporádicos. Hasta

1991 solo 25 casos de infecciones por *B. bronchiseptica* en humanos habían sido reportados (Woolfrey et al. 1991). Sin embargo, en un estudio en el 2006, se demostró la transmisión nosocomial de *B. bronchiseptica* por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados, en dos pacientes inmunocomprometidos por trasplante de células madre. Los datos sugieren que la fuente inicial pudo haber sido un perro mascota de uno de los pacientes (Huebner et al. 2006). Similar a lo ocurrido en el año 2008, en donde un infante de 6 semanas de nacido presentó un cuadro respiratorio por una cepa de *B. bronchiseptica* resistente a macrolidos, la cual se cree se transmitió a partir de un perro mascota (Rath et al. 2008). Este es el primer caso reportado de tosferina causada por *B. bronchiseptica* en México, sin embargo, es necesaria información adicional para conocer la fuente inicial de transmisión.

No se puede concluir si los brotes ocurridos en el estado de Nuevo León son resultado del estado inmunológico de la población, o bien, si es debido a los cambios que han ocurrido a través de los años en el esquema de vacunación en México. De la misma manera no se puede descartar si la cepa endémica posee ciertas características de virulencia que han favorecido su persistencia y diseminación en la población estudiada. Estudios de genotipificación por secuenciación de genes han demostrado un nuevo linaje hipervirulento, el cual se caracteriza por expresar altos niveles de la toxina de pertusis, favoreciendo la colonización del microorganismo en el tracto respiratorio. Dicho linaje ha sido atribuido a algunos brotes ocurridos en distintos países de Europa, Sur América, Norte América y Australia (de Gouw et al. 2014), sin embargo, en México aún no se ha demostrado.

9. CONCLUSIONES

1. Este es el primer estudio epidemiológico molecular de aislamientos de *B. pertussis* en el estado de Nuevo León, México.
2. Del total de los aislamientos colectados el 98% (352/359) fueron identificados como *B. pertussis*, el 1.7% (6/359) como *B. parapertussis* y solo el 0.3% (1/359) como *B. bronchiseptica*.
3. Del periodo estudiado, diciembre al 2006 a diciembre del 2014 el grupo de edad más afectado fueron los infantes ≤ 2 meses de edad, siguiéndoles el grupos de los niños de 3 meses-4 años de edad y los adultos de 20-49 años representando un 44, 31.5 y 14.5% del total de los aislamientos.
4. La mayor parte de los aislamientos se recuperaron en las jurisdicciones 4, 1 y 2, representando el 46, 21 y 13% del total de los aislamientos.
5. Los aislamientos de *B. pertussis* del estado de Nuevo León presentaron una similitud del 75 al 100% por el método de Electroforesis en Gel por Campos Pulsados.
6. Los resultados sugieren que la clona A es una cepa endémica del estado de Nuevo León y que persistió por siete años consecutivos, del 2008 al 2014.
7. Son necesarios otros estudios para determinar si la persistencia y la diseminación de la clona endémica es resultado de una cepa hipervirulenta o bien, es resultado del estado inmunológico de la población estudiada.

10.LITERATURA CONSULTADA

Advani A, Donnelly D, and Hallander H. 2004. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. J. Clinical Microbiology. 42:2890-2897.

Bisgard KM, Christie CD, Reising SF, Sanden GN, Cassiday PK, Gomersall C, Wattigney WA, Roberts NE, Strebel PM. 2001. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* by pulsed-field gel electrophoresis profile: Cincinnati, 1989-1996. Journal of Infectious Diseases. 9:1360-1367.

Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C. 2004. Infant pertussis: who was the source?. The Pediatric Infectious Disease Journal. 23:985-989.

Byrne S y Slack AT. 2006. Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999-2003. BMC Infectious Diseases. 16:6-53.

Caro V, Njamkepo E, Van Amersfoorth SC, Mooi FR, Advani A, Hallander HO, He Q, Mertsola J, Riffelmann M, Vahrenholz C, Von König CH, Guiso N. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. Microbes and Infection. 8:976-82.

Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. Manual de Vacunación 2008-2009. Secretaria de Salud (SS). México; 2008.

de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K., Diavatopoulos DA, Mooi RF. 2014. Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally, Plos One 9:e84523.

de Moissac YR, Ronald SL, and Peppler MS, 1994, Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Bordetella pertussis* in a whooping cough outbreak. Journal of Clinical Microbiology 2:398-402.

Garrity G, Brenner DJ, Staley TJ, Krieg RN, Boone RD, de Vos P, Goodfellow M, Rainey AF, Scheleifer KH. 2006. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Science & Business Media. pp. 662-663.

Guiso N. 2009. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines, Clinical Infectious Diseases. 10:1565-1569.

Hallander HO, Advani A, Donnelly D, Gustafsson L, Carlsson RM. 2005. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. Journal of Clinical Microbiology. 6:2856-2865.

Hardwick TH, Cassiday P, Weyant RS, Bisgard KM, and Sanden GN. 2002. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *Bordetella pertussis* isolated in the United States, 1935 to 1999. Emerging Infectious Diseases. 8:44-49.

Hegerle N, y Guiso N. 2014. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines, Expert Review Vaccines. 9:1135-1146.

Huebner ES, Christman B, Dummer S, Tang Y, y Goodman S. 2006. Hospital-Acquired *Bordetella bronchiseptica* Infection following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*. 7:2581-2583.

Mattoo S, Cherry JD. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*. 2:326-382.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology*. 12:274-288.

Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, Hoet B, Guiso N. 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 3:174-181.

Nar Otgün S, Durmaz R, Karagoz A, Esen B, Ertek M. 2011. Pulsed-field gel electrophoresis characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in Turkey in 2001-2009. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 10:1229-1236.

Moraga-Llop FA y Campins-Martí M. 2011. New perspectives on whooping cough in the XXI century. Are we failing to control it?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 8:561-563.

Navarrete NS, González RM, Ruiz MC, Casasola FJ. 1990. Epidemiologic study of a whooping cough outbreak in Rincon Grande, Veracruz. *Bol Med Hosp Infant Mex* 47:304-312.

Poolman JT y Hallander HO. 2007. Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert Rev Vaccines*. 1:47-56.

Rath BA, Register KB, Wall J, Sokol DM, Van Dyke RB. 2008. Persistent *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in an immunocompetent infant and genetic comparison of clinical isolates with kennel cough vaccine strains. *Clinical Infectious Diseases*. 6:905-908.

Secretaría de Salud, Dirección general de Epidemiología, Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de tosferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. 2015. Disponible en:

http://www.indre.salud.gob.mx/sites/indre/descargas/pdf/Lineamientos/lineamientos_para_la_vigilancia_de_tosferina_y_sindrome_coqueluchoide.pdf

Suárez IL, Herbas-RI, Gómez CM, Richardson VL. 2012. Shaping a new strategy against *B. pertussis*: a public health problem in Mexico. *BolMed Hosp Infant Mex*. 69(4):298–304.

Tatti MK., Sparks NK, Boney KO y Tondella ML. 2011. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, 49:4059-4066.

Thierry-Carstensen B, Dalby T, Stevner MA, Robbins JB, Schneerson R, Trollfors B. 2013. Experience with monocomponent acellular pertussis combination vaccines for infants, children, adolescents and adults, a review of safety, immunogenicity, efficacy and effectiveness studies and 15 years of field experience. *Vaccine*, 45: 5178-5191.

Weber C., Boursaux-Eude C., Coralie G., Caro V. y Guiso N., 2001, Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, Where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years, *Journal of Clinical Microbiology*, 39:4396-4403.

Woolfrey BF y Moody JA. 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* 3:243-255.

Ulloa GR y Avila ML. 2008. Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. *Expert Rev Vaccines*. 10:1569-1580.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Jessica Lizzeth Gutiérrez Ferman

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: Análisis epidemiológico de aislamientos de *Bordetella pertussis* del estado de Nuevo León

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 08 de julio del año de 1991, hija de Georgina Ferman Galán y Gelasio Gutiérrez Maldonado.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2013.

Experiencia profesional: asistente de investigación del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad, de noviembre del 2015 a febrero del 2016. Capacitación en bacteriología clínica en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de abril a agosto del 2015. Con gran experiencia en área clínica: microbiología médica, diagnóstico microbiológico, convencional y molecular y epidemiología. Asistencia al curso de actualización en procedimientos del laboratorio de bacteriología médica del 20 de marzo al 3 de julio. Asistencia al curso de “Métodos de laboratorio para el aislamiento e identificación de *Bordetella* spp.” y al curso Curso de “PCR en Tiempo real multiplex para la detección de diferentes especies de *Bordetella*” en julio del 2015. Segundo autor del artículo internacional titulado: *Stenotrophomonas maltophilia* in México: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. En la revista Journal of Medical Microbiology, 2014, 63:1524-1530.